ProteinExpress

CF002 Ver.1.0
Feb. 2010

Remarkable Yield Translation System Kit 【RYTS Kit】

取 扱 説 明 書

(Version 1.0)

- ◆ 本製品をご使用になる前にこの取扱説明書をよく読んで正しくご利用下さい。
- ◆ 本書をいつでもご覧になれるよう大切に保管下さい。
- ◆ 包装袋のラベルに記載されている有効期限内に必ずご使用ください。
- ◆ 本製品は研究用試薬ですので、臨床診断用途には使用しないでください。
- ◆ 万一、試薬などが目や皮膚に付着した場合、また飲み込んだりした場合には、すみやかに医師に相談し、その指示に従ってください。
- ◆ 廃棄される場合は、各施設の化学物質廃棄要領に従ってください。

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL : 043-202-5755
FAX : 043-202-5756
E-mail : tech@proteinexpress.co.jp

目次

1. 製品概要 2

2. 製品の特徴 2

3. 製品内容 3

4. ご使用にあたってご留意いただくこと 4

5. タンパク質合成反応の概要 4

6. タンパク質合成の鋳型作製 5

7. タンパク質合成プロトコール 7

付録 8

付録 1. タンパク質合成反応の評価方法 8
付録 1-1. CAT 活性測定による合成反応のコントロール 8
付録 1-2. RI 標識タンパク質の合成による合成反応の評価 11

付録 2. ピンポイント標識タンパク質合成への応用 12
付録 2-1. Clover*Direct*™ 製品の概要 12
付録 2-2. ピンポイント標識タンパク質の合成法 13

付録 3. トラブルシューティング 15

付録 4. 参考文献 16

製品についてのお問い合わせ先 16

1. 製品概要

本製品は、大腸菌等の宿主細胞の組換え体を作製することなく、タンパク質合成を行えるよう開発された大腸菌無細胞タンパク質合成キットです。転写・翻訳反応に必要な成分を全て含みますので、タンパク質合成の鋳型となる DNA や mRNA を反応液に加えるだけで、簡便で迅速なタンパク質合成を高効率に行うことができます。

本製品に含まれる大腸菌破砕抽出液(*E.coli* Lysate)は、広範な種類のタンパク質を著量に効率よく合成することを目的として、独立行政法人理化学研究所にて開発されました[1-4]。この方法で調製された *E.coli* Lysate は、タンパク質構造解析に活用され、これまで多大な実績を上げています。また、Clover*Direct*™ 製品とともにご利用いただくことで、タンパク質のアミノ酸の一つが蛍光色素等で標識されたピンポイント標識タンパク質を効率よく合成することができます。

本製品は、独立行政法人理化学研究所の特許(特開 2005-006646)の実施許諾を受けています。

2. 製品の特徴

本製品では、300µl の合成反応液あたり、最大 150 µg のタンパク質が合成可能です。また、緩衝液及びエネルギー再生系に必要な試薬類を含む透析外液と透析膜(分子量カットオフ値 15kDa 以下)を別途ご用意いただき、透析による反応液の交換を行いながら長時間(8～24 時間)の合成反応を行っていただくことにより、タンパク質の合成量を数倍以上に増大させることも可能です[3]。具体的な方法につきましてはお問い合わせ下さい(お問い合わせ先 p.16)。

本製品に含まれる *E.coli* Lysate の内在性エキソヌクレアーゼ活性は、大幅に抑えられております。これにより、PCR 産物等の直鎖状 DNA や mRNA をタンパク質合成の鋳型として用いることが可能となりました。また、上記ヌクレアーゼの影響により合成困難となり易い比較的長鎖のタンパク質合成にも有用です。実際に約 100kDa までのタンパク質合成の実績がございます。

【⚠注意】長鎖タンパク質の合成を 100%保証するものではございません。

3. 製品内容

■ 本製品に含まれるもの

バイアル No.	キャップ色	試薬名	本数	保存条件
1	白	*E.coli* Lysate	5	−80℃
2	紫	2× Reaction Mix	5	
3	青	Methionine	1	
4	橙	Enzyme Mix	1	−20℃
5	緑	CAT Control Vector 250ng/µl	1	
6	透明	Nuclease Free Water	1	

【各試薬について】

- *E.coli* Lysate: 翻訳反応に必要な因子を含む大腸菌破砕抽出液
- 2× Reaction Mix: 転写・翻訳反応に必要な試薬・緩衝液を含む溶液
- Methionine: アミノ酸の一つメチオニンの溶液
- Enzyme Mix: 転写・翻訳反応に必要な酵素類を含む溶液
- CAT Control Vector: Chloramphenicol acetyltransferase (CAT)の合成を行うためのコントロール反応用プラスミドベクター
- Nuclease Free Water: ヌクレアーゼフリー水

■ 品質保持期限

12 ヶ月

【⚠注意】上記保存条件での保証期間です。保存の際は、十分にご注意下さい。

4. ご使用にあたってご留意いただくこと

本製品をご利用いただく前に以下の点にご留意下さい。

1) タンパク質の中には、本製品による合成に適さないものもございます。対処法の一つとして、N 末へのペプチドタグを付加する方法を p.6 で紹介いたしますのでご参照下さい。
2) 本製品に使用する鋳型 DNA 等の調製の際は、ヌクレアーゼの合成反応液への持込が無いように鋳型 DNA 溶液の調製を行って下さい。
3) 本製品に含まれる *E.coli* Lysate 及び 2× Reaction Mix は、凍結融解を行うたびにタンパク質合成能が徐々に低下いたします。少量ずつご利用になりたい場合には、残りの溶液を小分けして、再度凍結保存して下さい。

5. タンパク質合成反応の概要

本製品に含まれる試薬類を混合して、あらかじめ調製した鋳型 DNA(環状鋳型および直鎖状鋳型)ないしは mRNA をその混合液に加えるだけで、図 1 のように一つの反応チューブ中で迅速かつ簡便にタンパク質合成反応を行うことができます。

タンパク質合成反応についてのご説明の該当ページ

・ 鋳型 DNA 及び mRNA の調製
⇒ p. 5 ～ p.6

・ タンパク質合成反応プロトコール
⇒ p. 7

・ タンパク質合成反応の評価法
⇒ p. 8 ～ p.11

・ トラブルシューティング
⇒ p. 15

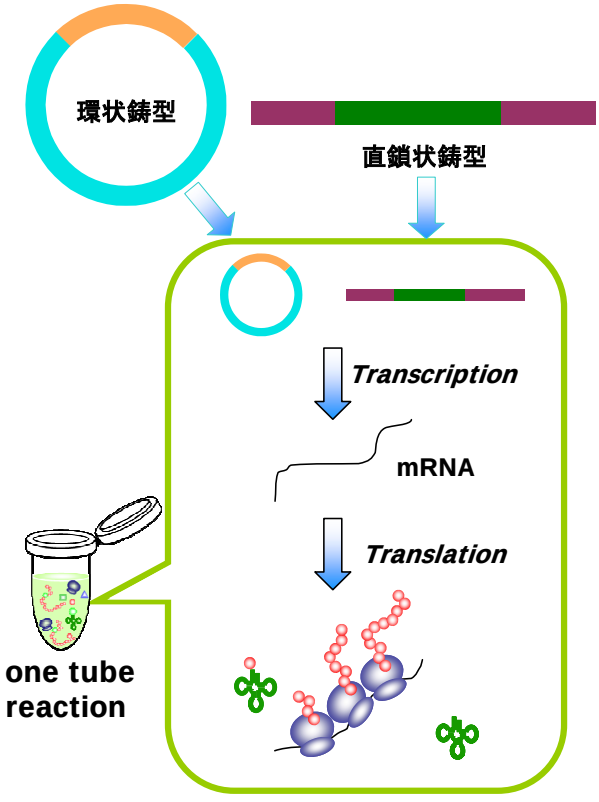


図 1:本製品を使用したタンパク質合成反応の模式図

5. タンパク質合成の鋳型 DNA 作製

1) 環状鋳型 DNA (プラスミド DNA)の作製

本製品に使用する環状鋳型は、T7 プロモーターの制御下にあるプラスミド DNA を元に作製して下さい。目的タンパク質遺伝子の開始コドンは RBS (リボソーム結合サイト)の直後に置き、終止コドンより 3'末側に T7 ターミネーター配列を置いて下さい。

【🖉注記】図 2 の例を参考に各転写・翻訳調節因子を配置して作製下さい。

図 2:転写・翻訳反応を行うための鋳型 DNA 作製例の模式図

2) 直鎖状鋳型 DNA(リニアテンプレート)の作製

本製品は、図 2 の例のような転写・翻訳反応に必要最小限の配列を含むリニアテンプレートを使用しても、タンパク質合成が可能です。プラスミド DNA を構築する必要が無いため、鋳型 DNA の作製のためのお時間を短縮可能です。

【✉お知らせ】リニアテンプレート作製キットを当社で別途販売しております。

- ◆ RYTS Linear Template Set for *E.coli* (His-tag) / Product Code: #TS001
- ◆ RYTS Linear Template Set for *E.coli* (ProX-tag) / Product Code: #TS002

3) mRNA の調製

本製品は、mRNA を用いて、タンパク質合成を行うことができます。市販の RNA polymerase や mRNA 合成キット等を別途用いていただき、あらかじめ合成した mRNA 50～100μg を 300μl の反応スケールに加えることによって、タンパク質合成が可能となります。mRNA を鋳型とする無細胞タンパク質合成は、翻訳反応の機構などを解明するツールとして本製品をご利用いただく場合に、純粋な翻訳反応のみのモニタリング用途等に有用と思われます。

なお、タンパク質合成のみを目的としてご利用いただく場合には、1)及び 2)でご紹介いたしました鋳型 DNA を用いる方法で反応を行われることをお勧めいたします。

【⚠注意】高次構造をとりやすいような塩基配列で構成されている mRNA では、タンパク質合成反応が極端に阻害されることがございますのでご注意下さい。

4) ProX® tag を用いた鋳型を作製する。

タンパク質の中には、本キットのような無細胞タンパク質合成系では、合成量が非常に少ないか全く合成されないものもございます。このようなケースへの対処法として、目的タンパク質の N 末端に十数アミノ酸分の短いタグ配列（ペプチドタグ）を付加し、合成量を増加させる方法がございます。

合成量増加のためのペプチドタグの一つとして当社が開発した ProX™ tag (図 3) を目的遺伝子配列の N 末端側に付加することをお勧めいたします。ProX™ tag は、大腸菌無細胞タンパク質合成反応において、合成量の増加効果を得られるよう最適化したコドン配列で構成されております。

【✉お知らせ】ProX™ tag は、当社が開発したタンパク質ピンポイント標識にも有効にご利用いただけます。ピンポイント標識の概要および ProX ™ tag を使用することによるピンポイント標識タンパク質合成の利点等につきましては p. 13 に記載致しましたのでご参照下さい。

5' -	AUG	UCU	AAA	CAA	AUC	GAA	GUA	AAC	UUU	UCU	AAU	GAG	- 3'
	Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Asn	Phe	Ser	Asn	Glu	

図 3: ProX™ tag のコドン配列と発現コンストラクト構築例

6. タンパク質合成プロトコール

【別途ご用意いただくもの】

- タンパク質合成の鋳型： 環状 DNA、直鎖状 DNA または mRNA
- 反応チューブ： 1.5 ml tube (タンパク質低吸着品を推奨)
- 反応を行うためのブロックインキュベーターもしくはウォーターバス

【実験を始める前の注意事項】

■ 試薬は全て氷上で溶解し、反応液の調製も氷上で行ってください。

反応溶液の組成（表 1）

バイアル番号(キャップ色):使用試薬名	使用量
1 (白):*E.coli* Lysate	100 µl
2 (紫):2× Reaction Mix	150 µl
3 (青):Methionine	3 µl
4 (橙):Enzyme Mix	15 µl
鋳型 DNA 溶液:環状 DNA または直鎖状 DNA	0.4 – 1.0 µg
6 (透明):Nuclease Free Water	up to 300µl

【操作手順】

(Step1) 表 1 に示す試薬をそれぞれ 1.5ml チューブへ入れ、ピペッティングにより、溶液が均一になるまで十分に混合して下さい。混合後に 30℃、2 時間でタンパク質合成反応を行って下さい。

【⚠注意】反応液中に気泡が生じないようにピペッティングして下さい。

【🖉注記】CAT タンパク質合成においては、1 時間の反応で最大合成量の 85～95%の合成が完了いたします。合成タンパク質の収量より時間短縮を優先される場合、1 時間の合成反応でも十分な合成が可能です。

(Step2) 反応液を次の実験等に用いる場合、準備の間、氷上または 4℃で保存して下さい。凍結保存を行う場合は、-20℃以下で保存して下さい。

【⚠注意】凍結融解や長期保存により、活性等を失うタンパク質もございますので、凍結保存の場合にはご注意下さい。

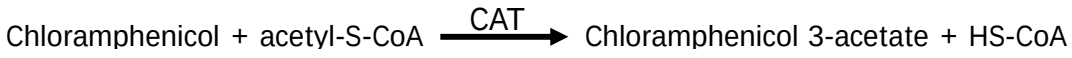
付録 1. タンパク質合成反応の評価方法

合成反応の確認のためにコントロール反応を行うことをお勧めします。合成反応の評価法として、CAT 活性法と RI 標識法の 2 種類の方法を紹介いたします。

付録 1-1. CAT 活性測定による合成反応のコントロール

【CAT 活性測定の原理】

CAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)はアセチル CoA のアセチル基をクロラムフェニコールに転移させる酵素です(以下の反応式)。



クロラムフェニコールのアセチル化により生じた HS-CoA を定量することで CAT の酵素活性を測定します。HS-CoA の持つチオール基の検出試験薬として、DTNB を使用します。より詳細な原理につきましては、[p.16;付録 3. 参考文献]の文献番号 5) をご参照下さい。

【測定を始める前に】

- 全ての作業は氷上で行ってください。
- [p.7;4. タンパク質合成プロトコール]に従い、CAT Control Vector を用いて、CAT タンパク質の合成反応を行って下さい。
- CAT タンパク質合成反応液は、4℃か氷上に静置しておき、なるべくすみやかに測定に移って下さい。
- 後日測定を行われる場合は、一旦、反応液を-20℃で凍結保存して下さい。
  凍結保存後の測定では、CAT 活性が若干低下しますので、正確な定量が必要な場合には、反応直後の活性測定をお勧めいたします。

【ご用意いただく試薬・機器】

- 1.5 ml tube (タンパク質非吸着が望ましい。)
- 分光光度計 (波長 412 nm の測定が可能なもの)
- 石英セル (光路長 1 cm のもの)
- 1.25 M Tris/HCl pH 7.8
- 4 mg/ml DTNB [CAS No. 69-78-3] (溶解液:1.25 M Tris/HCl pH 7.8)
- 5 mM Acetyl CoA [CAS No. 72-89-9]
- 5 mM Chloramphenicol (50%エタノール溶液)
- 5% Polyethylenglycol 8,000 (PEG 8000 :平均分子量 8,000)
- 85% Glycerol
- 0.5 M Dithiothreitol (DTT)

発色液　組成（表 2）；　25 反応分

使用試薬	[終濃度]	使用量
4 mg/ml DTNB	[0.4 mg/ml]	1 ml
5 mM Acetyl CoA	[0.1 mM]	0.2 ml
5 mM Chloramphenicol	[0.1 mM]	0.2 ml
Up to 10 ml with ultra pure water		

CAT Dilution Buffer　組成（表 3）

使用試薬	[終濃度]	使用量
1.25 M Tris/HCl pH 7.8	[0.5 M]	4 ml
5% PEG 8000	[0.5 %]	1 ml
85% Glycerol	[4.25 %]	0.5 ml
0.5 M DTT	[0.5 mM]	10 µl
Up to 10 ml with ultra pure water		

【操作手順】

(Step1)　発色液（表 2）、CAT Dilution Buffer (表 3)を調製してください。
【⚠注意】各溶液は用事調製して下さい。CAT Dilution Buffer は、DTT を加えない状態であれば、-20℃で数ヶ月保存することができます。

(Step2)　CAT コントロール合成反応液を CAT Dilution Buffer で希釈します。希釈する際は、以下のように 2 段階希釈で行うことをお勧めいたします。5 µl のサンプルを 1：20（サンプル 5 µl + CAT Dilution Buffer 95 µl）でまず希釈し、その後に、1：50（第 1 の希釈液　10 µl + CAT Dilution Buffer 490 µl）の 2 段階希釈で 1,000 倍に希釈します。
【⚠注意】合成反応液中に比べ、希釈液中の CAT は活性を失いやすくなりますので作業はなるべく迅速に行って下さい。

(Step3)　発色液 400µlを 1.5ml チューブに分注してください。この発色液を測定したい数だけ用意します。(Step2)で調製した合成反応液の希釈サンプル 3 µl を用意した発色液に加えてください。同様にブランクサンプルとして、CAT Dilution Buffer 3 µl を発色液に加えたものもご用意下さい。
【✎注記】1 反応液あたり数サンプルずつ測定されるようお勧めします。

(Step4)　30 分、37℃の酵素反応を行います。反応後、サンプルを速やかに氷上に置き、吸光度の測定に移って下さい

(Step5)　各サンプルを石英セルに入れ、波長 412 nm の吸光度を測定下さい。
【⚠注意】サンプリング量は、石英セルの容量に合わせて下さい。
光度計に入れる前に、石英セルを良く拭いて下さい。

【CAT の活性値及び合成量の計算方法】

測定した λ_{max} = 412 nm における吸光度 A_{412} (HS-CoA のチオール基により還元を受けた還元型 DTNB の濃度に依存して増加します)から、以下の計算方法で CAT タンパク質の活性値及び合成量を算出します。より詳細な原理につきましては、参考文献 5)をご参照下さい。

i)《発色液中の CAT 活性値》の計算

$$CAT\ (U/ml) = \{(A_{412} - A_{412\ Blank}) \times 10^6\} / (\varepsilon_{412} \times L \times T)$$

$A_{412\ Blank}$	： ブランクサンプルの吸光度
L (cm)	： 石英セルの光路長（1 cm）
ε_{412} ($cm^{-1} \cdot M^{-1}$)	： 還元型 DTNB のモル吸光係数 = 13,600 $cm^{-1} \cdot M^{-1}$
T (min)	： 酵素反応の時間（上記手順では 30 分）

ii) 発色液中の CAT 活性値から求める《発色液中の CAT 重量濃度》の計算

$$CAT\ (\mu g/ml\ [\ Assay\ mix\ ]) = CAT\ (U/ml) / S$$

S (U/μg)	： CAT タンパク質 1 μg あたりの比活性 = 150 U/μg

iii)《合成反応液中の CAT 合成量》の計算

$$CAT\ (\mu g/ml\ [\ Reaction\ mix\ ]) = \{CAT\ (\mu g/ml\ [Assay\ mix]) \times D\} / (V / C)$$

V (μl)	： 反応液希釈サンプルの液量（上記手順では 3 μl ）
C (μl)	： 発色液の液量（上記手順では 400 μl ）
D	： 用いた翻訳反応液の希釈率（上記手順では 1,000 倍希釈）

付録 1-2. RI 標識タンパク質の合成による合成反応の評価

RI 標識したタンパク質はオートラジオグラフィを行うことにより、検出することが可能です。ここでは、^{35}S 標識したメチオニンを用いて検出を行う方法を紹介致します。

【ご用意いただくもの】

- 【^{35}S】Methionine (>1,000 Ci mmoL) 10mCi/mL
- 一般的な SDS-PAGE 用の試薬・機器
- 一般的な CBB 染色・脱色のための試薬・機器
- オートラジオグラフィが行える感光フィルム等

反応溶液　組成（表 4）

バイアル番号（キャップ色）:使用試薬名	使用量
1 (白):*E.coli* lysate	20 µl
2 (紫):2× Reaction Mix	30 µl
【^{35}S】Methionine (>1000 Ci mmoL) 10mCi/mL	0.6 µl
4 (橙):Enzyme Mix	3 µl
鋳型 DNA 溶液:環状 DNA または直鎖状 DNA	0.1－0.2 µg
6 (透明):Nuclease Free Water	up to 60 µl

【操作手順】

反応液は(表 4)の組成で調製し、標準反応プロトコール(p.7)の手順に従って合成反応を行って下さい。

【⚠注意】RI のお取り扱いの際には、国や自治体、所属施設等が定める法令、省令ならびに規則を遵守して下さい。また、法令等に定められた条件を満たす RI 実験施設内で行って下さい。

【RI 標識したタンパク質の検出】

(Step1)　SDS-PAGE の後、通常の方法で CBB 染色および脱色を行います。

(Step2)　染色したゲルを乾燥させ、オートラジオグラフィを行い評価します。

【✎注記】具体的なオートラジオグラフィの方法は、お手持ちの感光フィルム等の使用方法をご参照下さい。フィルム等への露光時間は、RI 標識タンパク質の発現量に依存しますので 8～20 時間を目安として条件検討を行って下さい。

付録 2. ピンポイント標識タンパク質合成への応用

RYTS Kit は、以下で紹介いたします Clover*Direct* ™ 製品とともにご利用いただくことで、タンパク質のアミノ酸一つが蛍光色素等で標識されたピンポイント標識タンパク質を合成することができます。

付録 2-1. Clover*Direct*™ 製品の概要

Clover*Direct*™ 製品は、タンパク質の任意の位置のアミノ酸をピンポイントに標識するための標識アミノ酸結合型人工 tRNA 試薬です。標識部位の指定は終止コドンの1つである UAG コドン(アンバーコドン)もしくは遺伝暗号拡張型 4 塩基コドン(CGGG コドン)で行います。まず、タンパク質の遺伝子上の任意の箇所に UAG コドンまたは CGGG コドンを挿入または置換した鋳型 DNA を準備致します。この鋳型 DNA を、Clover*Direct* ™ 試薬とともに RYTS Kit のタンパク質合成反応液に加えることで、人工 tRNA が挿入・置換したコドンを特異的に読み取り、タンパク質の指定された位置に標識アミノ酸が導入されます。より詳細な原理等は、Clover*Direct* ™ 製品のマニュアルないしは、当社のホームページ(下記 URL)にてご確認下さい。

Clover*Direct*™ 製品の標識タンパク質合成原理のページ
http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_2.htm

【✉お知らせ】Clover*Direct* ™ 製品 4 種を株式会社フナコシ様より販売

製品名	商品コード
Clover*Direct*™ HiLyte Fluor 488	CLD01, CLD05
Clover*Direct*™ TAMRA	CLD02, CLD06
Clover*Direct*™ ATTO633	CLD03, CLD07
Clover*Direct*™ Biotin	CLD04, CLD08

【✉お知らせ】その他の非天然アミノ酸結合型の tRNA 製品の販売や受託製造も行っておりますので、以下アドレスのページをご覧下さい。

Clover*Direct*™ 製品ラインナップのページ
http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_7.htm

Clover*Direct*™ 受託合成サービスのページ
http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_6.htm

付録 2-2. ピンポイント標識タンパク質の合成法

反応溶液　組成（表 5）

バイアル番号(キャップ色):使用試薬名	使用量
1 (白):*E.coli* Lysate	100 µl
2 (紫):2× Reaction Mix	150 µl
3 (青):Methionine	3 µl
4 (橙):Enzyme Mix	15 µl
鋳型 DNA 溶液:環状 DNA または直鎖状 DNA	0.4 – 1.0 µg
溶解した Clover*Direct*™ 試薬	1 チューブ分
6 (透明):Nuclease Free Water	up to 300µl

【操作手順】

(Step1)　Clover*Direct*™ 試薬の乾燥粉末がチューブの蓋等に付着している場合がありますので、粉末をチューブの底に落としてください。その後、Clover*Direct*™ 試薬付属の tRNA buffer を 10-30 µl 加え、よく撹拌して粉末を完全に溶解してください。

【✐注記】Clover*Direct*™ 試薬付属のプロトコールでは、1 チューブあたり 30 µl の tRNA buffer を加えるよう記載されておりますが、鋳型 DNA 濃度が薄い等の理由で反応ボリュームが 300µl を超えてしまうような場合には、加える tRNA buffer の量を減らして溶解を行って下さい。10µl 程度までは、問題なく溶解を行うことが可能です。

(Step2)　反応液は(表 5)の組成で調製し、標準反応プロトコール(p.7)の手順で合成反応を行って下さい。

(Step3)　反応液を氷上に移して反応を停止し、SDS-PAGE 等で発現確認を行ってください。

【✐注記】合成された蛍光標識タンパク質のご用途によっては、蛍光標識タンパク質の精製・単離を行って下さい。His tag などのペプチドタグを使用した精製によって、標識タンパク質を単離することができます。完全長で合成された標識タンパク質のみを高純度で単離するために、精製用のタグ配列は目的遺伝子の C 末側に付加することをお勧めいたします。

【🖉注記】合成された標識タンパク質量が少ない場合には、p.6 でも紹介いたしました ProX™ tag の 9 番目のコドンを UAG ないしは CGGG に置換したペプチドタグ(図 4)を目的遺伝子配列の N 末端側に付加することをお薦めいたします。ProX® tag の効果により、ピンポイントに蛍光標識されたタンパク質を効率よく合成することができます。

5' -	AUG	UCU	AAA	CAA	AUC	GAA	GUA	AAC	UAG or CGGG	UCU	AAU	GAG	- 3'
	Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Asn	Xaa	Ser	Asn	Glu	

図 4： ピンポイント標識用 ProX™ tag のコドン配列

付録 3. トラブルシューティング

■ タンパク質の合成量が少ない、あるいは全く合成されない	
1) 試薬の使用期限が切れている。	使用期限を守ってご使用下さい。新しいキットを購入して再度反応を行って下さい。
2) 試薬の保存状態が適切でない。	－80℃で保存して、一旦溶解したものはお早めにお使い下さい。
3) DNase, RNase の混入。	手袋等を着用し、ヌクレアーゼの混入には十分注意してください。また、鋳型 DNA の作製時の後処理にフェノール/クロロホルム処理を行い、DNase 及び RNase を不活性化して下さい。
4) 無細胞タンパク質合成系では合成が困難な遺伝子である。	ProX ™ tag を使用することによって改善される場合もありますのでお試しください。

■ タンパク質の活性が低い、あるいは全くみられない。	
1) ジスルフィド結合が必要なタンパク質である。	酸化型グルタチオン(GSSG)を翻訳反応中に入れると改善される場合があります。 (終濃度 10 mM 程度)
2) 翻訳後修飾が必要なタンパク質である。	大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系では翻訳後修飾はされません。
3) タンパク質が正常にフォールディングされていない。	タンパク質の種類によっては、通常の条件下で正しくフォールディングされない可能性があります。リフォールディング条件を検討してください。

上記の解決法で改善できない場合は当社までご相談ください。

お問い合わせ先 ⇒ p.16

付録 4. 参考文献

1) Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation.
Eiko Seki, Natuko Matsuda, Shigeyuki Yokoyama and Takanori Kigawa.
Analytical Biochemistry, 377, 156-161 (2008)

2) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli.*
Dong-Myung Kim, Takanori Kigawa, Cha-Yong Choi and Shigeyuki Yokoyama.
Eur. J. Biochem., 239, 881 -886 (1996)

3) Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression.
Takanori Kigawa, Takashi Yabuki, Natsuko Matsuda, Takayoshi Matsuda, Rie Nakajima, Akiko Tanaka and Shigeyuki Yokoyama.
Journal of Structural and Functional Genomics, 5, 63–68 (2004)

4) Automated system for high-throughput protein production using the dialysis cell-free method.
Masaaki Aoki, Takayoshi Matsuda, Yasuko Tomo, Yukako Miyata, Makoto Inoue, Takanori Kigawa and Shigeyuki Yokoyama.
Protein Expression and Purification, 68, 128-136 (2009)

5) Chloramphenicol Acetyltransferase from Chloramphenicol-Resistant Bacteria.
W. V. Shaw.
Methods Enzymol., 43, 737-755 (1975)

◆ 製品についてのお問い合わせ先

株式会社 プロテイン・エクスプレス 研究開発部
〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL: 043-202-5755（代表） / FAX: 043-202-5756
E-mail ： tech@proteinexpress.co.jp
URL ： http://www.proteinexpress.co.jp

【メモ用紙】